様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２４年　５月　７日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2009～2011
課題番号：21657024
研究課題名（和文）　「植物界」の新概念と新分類体系を構築する系統学的研究

研究課題名（英文）Phylogenetic studies for construction of a new concept of the kingdom Plantae and a new taxonomic system of the eukaryotes

研究代表者
野崎　久義（NOZAKI HISAYOSHI）
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号：40250104

研究成果の概要（和文）：
一次共生植物が単系統であると示した既存のデータの再検討による再解析並びに自由性生活の無色ミドリムシ類 *Peranema* の EST データの構築と利用を実施した結果、一次共生植物が単系統と解析されている原因が遺伝子進化速度が高い細胞内寄生虫や繊毛虫等の影響である可能性が示せた。また、色素体二次共生植物のクロララクニオン藻とミドリムシ藻で、それぞれ緑藻の二次共生以前の隠された紅藻の２または３次共生が核ゲノムの解析で明らかになり、二次共生植物の概念も刷新しつつある。

研究成果の概要（英文）：
Based on the re-examinations and re-analyses of the sequence data previously used for macrophylogeny of eukaryotes as well as on the construction of EST data from the free-living, plastid-lacking euglenoid *Peranema*, it was suggested that the fast evolving genes from intracellular endoparasites, ciliates etc. may have mislead the nonmonophyly of the primary phototrophs. Since our nuclear genome analyses also demonstrated the possible cryptic secondary or tertiary endosymbiosis of a red alga before the secondary endosymbiosis of a green alga in Chlorarachniophyta or Euglenophyta, respectively, the concept of the secondary phototrophs is now renewing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	500,000	0	500,000
２０１０年度	2,200,000	0	2,200,000
２０１１年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総　計	3,200,000	150,000	3,350,000

研究分野：生物学
科研費の分科・細目：基礎生物学、生物多様性・分類
キーワード：大系統、大分類、植物界、色素体一次共生、色素体二次共生、細胞内共生的遺伝子水平伝達

１．研究開始当初の背景

太陽の光を取り込んで地球上のほとんど総べての生物のエネルギーを供給する「植物」の起源は約 20 億年前に起きたたった一個のシアノバクテリア（藍藻）が真核生物に取り込まれて色素体（葉緑体）になったこと（色素体一次共生）と考えられている。しかし、その後の進化に関して様々な議論が交わ

されている。近年最も有力だった説は一次共生で取り込んだ色素体をもつ「一次共生植物」３群[緑色植物（陸上植物と緑藻類）、紅色植物（紅藻）、灰色植物（主に単細胞性の淡水産藻類）]だけが共通の祖先をもち、「植物界」として分類しようとするものであった(e.g.Cavalier-Smith 2003, IJSEM)。ところが、2001年から開始した原始紅藻シゾンのゲノムプロジェクトで得られた４個の保存的な核遺伝子を用いた系統解析を実施したところ、緑色植物と紅色植物の系統は分離し、その間から一次共生色素体を消失した２鞭毛性の生物が進化したことが推測された（Nozaki et al. 2003, JME)。従って、我々は「植物」の概念を現在は色素体をもたない原生生物群まで拡大する「”超”植物界（“Super” Plant Kingdom）仮説」を提唱した。その後、143 個の核遺伝子を用いた系統解析が実施され，高い信頼度で一次共生植物３群だけが共通の祖先をもつことが示され、我々の「”超”植物界仮説」を否定した（Rodriguez-Ezpeleta et al. 2005, Curr. Biol.)。ところが，この研究の143個の遺伝子には進化速度が高いものが多く含まれており、解析された原生生物の分類群は限られていた。従って我々は、進化速度の遅い 19 個の核遺伝子を選択し、最近続々と公開されはじめたゲノムデータ等を用いて解析に用いる自由生活性の生物群を増大させ、合計33分類群を系統解析した(Nozaki et al. 2007, MBE)。解析結果は紅色植物または紅色植物とエクスカバータ（形態的に原始的される単細胞の鞭毛虫）が根元の系統に位置することを示した。また、統計的な検定で紅色植物と緑色植物が単一起源であることは棄却された。しかし、その後発表された真核生物の大系統に関する核遺伝子の多遺伝子解析は相変わらず、寄生虫や繊毛虫を解析に加えたり、進化速度の速い遺伝子を用いたり、緑色植物と紅色植物だけを強く引きつける特異な情報をもつ EF-2 遺伝子（Stiller et al. 2001, JME）を解析に加えており、その結果は一次共生植物の３群が単系統と解析されている(Hackett et al. 2007, MBE; Burki et al. 2008. Biol. Lett.)。従って、寄生虫・繊毛虫の使用や、解析する生物間での進化速度の差がある場合の系統解析への影響を客観的に評価する実際のデータとシミュレーションデータの両方を用いた研究が望まれる。

２．研究の目的

20億年前に起きた「植物」のはじまりは真核生物がシアノバクテリア（藍藻）を奴隷化し、自らの色素体（葉緑体）としたことに始まるが、その後の進化に関しては様々な説がある。最近我々は、太古の進化の推測に適切と考えられた保存的遺伝子だけを用いて大規模なスーパーコンピュータ解析を実施した結果、色素体の獲得後、様々な系統で色素体を失ったという説を支持した（Nozaki et al. 2007, MBE)。この結果は、現在は色素体を欠く多くの鞭毛虫等の生物群も「植物」として分類すべきであると 2003 年に我々が提唱した”超”植物界(“Super” Plant Kingdom)仮説の復権を意味した(Nozaki et al. 2003, JME)。しかし、”超”植物界仮説は最近でも他の研究者が発表した系統解析結果とは矛盾する。本研究ではこの仮説を正しく検証し、植物界に関する新しい概念をより説得力のあるものするために、他の研究者が用いた多遺伝子系統解析のデータを再解析することとシミュレーションデータによる系統解析を実施する。その結果、大系統における高置換配列（遺伝子と生物の種類による）の影響を客観的に評価することができ、「どのような配列データが大系統の基部を正しく解き明かすか」を明らかにする。更に、新たに自由生活性の原生生物の EST データを構築して解析に加え、幅広い分類群を扱ったより自然な真核生物の系統関係を推測し、説得力のある自然な大分類体系と植物界の概念を世界に提示する。

３．研究の方法

真核植物の初期進化のような大系統または根元の解析に「遺伝子置換が速い遺伝子」と「遺伝子置換が速い寄生虫等の生物」がどのような影響を及ぼしているかを解析し、それに基づき「最も自然な系統解析結果が得られると期待されるデータマトリックス」を用いた系統解析を実施する。

基本的に本研究は以下のような柱立てである。

① 既に発表された大系統の研究で一次共生植物が単系統であると示したデータの再解析

②寄生虫に代わる自由性生活の原生生物である無色ミドリムシ藻 *Peranema* の EST データの構築とその利用

③ 大系統における高置換配列（遺伝子と生物の種類による）の影響の客観的評価

４．研究成果

色素体は太古のシアノバクテリアの一次共生に由来し、二次共生で様々な原生生物に伝搬した。緑色植物はシアノバクテリアと基本的に異なる色素組成をもつ点で同じ一次共生植物の紅色植物や灰色植物とは異なる。最近の研究では一次共生植物３群が単系統である場合と非単系統の場合があり、多くの議論がある。我々は真核植物の真の系統を推測するには進化速度が遅い遺伝子だけを用いて、ミトコンドリアを欠く寄生虫のような遺伝子進化の特異な生物を排除すべきであると

いう立場で系統解析を進めているが(Nozaki et al. 2003, JME)、緑色植物の姉妹群と二次共生のハプト藻の系統的位置に関してはギャップの多い灰色植物（27%, 全体 8%）の有無で異なる結果であった(Nozaki et al. 2007, MBE)。2009 年度は Nozaki et al.（2007）の用いた進化速度の遅い 19 核遺伝子を用いて、ギャップを減少させて（灰色植物 11.7%、全体 6.9%）再解析した。また、灰色植物やハプト藻は系統樹の枝が短く寄生虫等の長枝の影響を受けていることが予想されたので(Nei 1996, Ann. Rev. Gennet.)、長枝 OTU を排除した解析も実施した。その結果、紅色植物と灰色植物は"超"植物界の中で基部に位置し、緑色植物はハプト藻とストラメノパイル・アルベオラータからなる単系統群（クロムアルベオラータ）と姉妹群を形成し、この関係は色素体ターゲット遺伝子 *ispG*、*fabI* それぞれの共通の遺伝子置換からも推測された。Hackett et al.（2007, MBE）は核コード遺伝子を用いた大系統解析で、ミトコンドリアを欠くギアルディア等の寄生虫を含めた系統樹を構築しており、その結果は一次共生植物が単系統と解析している。本年度、彼らのデータからギャプが 50%に近い灰色植物・クリプト植物や寄生虫等を排除し、EF-2 を排除した再解析を実施した。その結果、紅色植物とエクスカバータがバイコンタの根元に位置するという上述の系統関係と基本的に一致した（Nozaki et al. 2009, MPE）。

2007 年に我々が一次共生植物単系統説に反論を示して以来（Nozaki et al. 2007, MBE）、真核植物と原生生物の多遺伝子系統解析の研究は高い支持率で一次共生植物を単系統とは解析しないのが一般的になって来た。これはハプト藻のゲノム・EST データの公開によることが多いと思われ、ハプト藻は一次共生植物と近縁であると解析される場合が多い（e. g. Hampl et al. 2009, PNAS; Parfrey et al. 2010, Syst. Biol.）。我々は既に進化速度の遅い核コード遺伝子だけを利用したギャップの少ないデータマトリックスを用いて系統解析した結果、ハプト藻は一次共生植物よりも不等毛植物・アルベオラータ(SA）に近縁であり、解析された統計的支持率はエクスカバータやアピコンプレクサの存在で低下したことを明らかにしている（Nozaki et al. 2009, MPE）。しかし，この研究ではミドリムシ類は使用されていなかった。2010 年度我々は新たに無色ミドリムシ類 *Peranema* の EST データを新たに構築し、このデータと既存の *Euglena* の EST データ並びにゲノムデータが公開された不等毛植物 *Ectocarpus* と *Aurerococcus* を Nozaki et al.（2009）に加え，系統解析を実施した。その結果、ハプト藻の解析された系統的位置は細胞内寄生生物のアピコンプレクサの有無に左右され、アピコンプレクサと共に解析した場合は弱く SA に近縁、または緑色植物と姉妹群となり、アピコンプレクサを削除すると高い支持率で SA に近縁となった。一方、Parfrey et al.（2010）のデータはミトコンドリアを欠くエクスカヴァータや微胞子虫を含むが、これらを代表とする細胞内寄生生物を削除して再解析した結果でも同様のハプト藻の系統的位置のゆらぎが得られた(Nozaki et al. 投稿中)。

更に我々は、ミドリムシ（*Euglena gracilis*）のゲノム情報を対象にして、東京大学医科学研究所のスーパーコンピュータを使った大規模分子系統解析プログラムを独自に構築し、祖先的原生生物、共生藻類、その他に由来すると考えられる遺伝子のグループに振り分ける解析を行うことで、この「その他」の遺伝子がどのような進化的由来を持つかを検証し、太古の遺伝子水平伝達の痕跡とも言うべき遺伝情報を抽出することを試みた。その結果、ミドリムシの核ゲノム（祖先的原生生物に由来する）には、他の藻類の持つ遺伝子と類似性を持つ遺伝子が多く保存されており、その中でも、紅藻に由来する葉緑体を持つ二次植物（ここでは紅色系二次植物と呼ぶ）と進化的に起源が近いと考えられる遺伝子が複数見つかってきた。これはミドリムシ藻の祖先で緑藻の二次共生以前の隠された紅色系二次植物の三共生の存在を示唆した（Maruyama et al. 2011. BMC Evol. Biol.）。

緑色系二次共生藻のもう一つの系統、クロララクニオン藻はミドリムシ藻とは独立した系統の宿主真核生物に緑藻が二次共生して誕生したと考えられるが、色素体共生由来の核コード遺伝子の中には緑色植物起源でないものがあることが最近のゲノム情報の解析から明らかになりつつある。Phosphoribulokinase（*PRK*）遺伝子は保存的でシアノバクテリアを祖先とする典型的な核コード光合成遺伝子であるが、先行研究では上記２系統から得られた遺伝子がともに緑藻起源でないことが示唆されている（Petersen et al. 2006, JME）。しかし、解析されたサンプルがそれぞれで１種であったために、祖先段階の遺伝子水平伝達か最近の補食等による偶発的なものかが議論できなかった。2010-2011 年度、我々は緑色系二次共生藻の２系統の種数を増大した *PRK* 遺伝子の系統解析を実施した。その結果、系統的位置と挿入／欠損配列から、ミドリムシ藻綱の２属２種の *PRK* が不等毛植物起源で、クロララクニオン藻綱の３属３種の *PRK* が紅藻起源であることが明らかになった。この結果はクロララクニオン藻で初めて過去の隠れた紅藻の細胞内共生を示唆した(Yang et al.

2011, BMC Res. Notes)。すなわち、クロララクニオン植物（緑のアメーバ）も昔は赤かったかもしれないいう仮説である。

このように、二次共生植物が現在の色素体を獲得する以前に全く異なる色素体を持っていた可能性が、本科学研究費による研究によって次々と明らかになっている。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 9 件）

①Yang, Y., Maruyama, S., Sekimoto, H., Sakayama, H. and Nozaki, H. 2011. An extended phylogenetic analysis reveals ancient origin of "non-green" phosphoribulokinase genes from two lineages of "green" secondary photosynthetic eukaryotes: Euglenophyta and Chlorarachniophyta. BMC Research Notes 4: 330.
DOI: 10.1186/1756-0500-4-330［査読有］.

②Maruyama, S., Suzaki, T., Weber, A. P. M., Archibald, J. M. and Nozaki, H. 2011. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer gives rise to genome mosaicism in euglenids. BMC Evol. Biol. 11: 105.
DOI: 10.1186/1471-2148-11-105［査読有］.

③Kato, S., Misawa, K., Takahashi, F., Sakayama, H., Sano, S., Kosuge, K., Kasai, F., Watanabe, M., Tanaka, J. and Nozaki, H. 2011. Aquatic plant speciation affected by diversifying selection of organelle dna regions. J. Phycol. 47: 999-1008.
10.1111/j.1529-8817.2011.01037.x［査読有］.

④Yokoyama, A., Takahashi, F., Kataoka, H., Hara, Y. and Nozaki, H. 2011. Evolutionary analyses of the nuclear-encoded photosynthetic gene psbO from tertiary plastid-containing algae in Dinophyta. J. Phycol.47: 407-414.
DOI:10.1111/j.1529-8817.2011.00961.x［査読有］.

⑤Yoshida, S., Maruyama, S., Nozaki, H. and Shirasu, K. 2010. Horizontal gene transfer by the parasitic plant *Striga hermonthica*. Science 328: 1128.
DOI: 10.1126/science.1187145［査読有］

⑥Maruyama, S., Junichi Sugahara, J., Kanai, A. and Nozaki, H. 2010. Permuted tRNA genes in the nuclear and nucleomorph genomes of photosynthetic eukaryotes. Mol. Biol. Evol. 27: 1070-1076.
DOI: 10.1093/molbev/msp313［査読有］

⑦Ishikawa, M., Takahashi, F., Nozaki, H., Nagasato, C., Motomura, T. and Kataoka, H. 2009. Distribution and phylogeny of the blue-light receptors aureochromes in eukaryotes. Planta 230: 543-552.
DOI: 10.1007/s00425-009-0967-6［査読有］

⑧Nozaki, H., Maruyama, S., Matsuzaki, M., Nakada, T., Kato, S. and Misawa, K. 2009. Phylogenetic positions of Glaucophyta, green plants (Archaeplastida) and Haptophyta (Chromalveolata) as deduced from slowly evolving nuclear genes. Mol. Phylog. Evol. 53: 872-880.
DOI:org/10.1016/j.ympev.2009.08.015［査読有］

⑨Maruyama, S., Matsuzaki, M., Misawa, K. and Nozaki, H. 2009. Cyanobacterial contribution to thegenomes of the plastid-lacking protists. BMC Evol. Biol. 9: 197.
DOI:10.1186/1471-2148-9-197［査読有］

〔学会発表〕（計 6 件）

①松崎素道、増田功、黒岩晴子、黒岩常祥、野崎久義、北潔 “蛍光融合タンパク質を利用したパーキンサス色素体およびミトコンドリアの細胞学・生化学的解析” (2011年9月17日ー19日、日本植物学会第75回大会、東京大学駒場キャンパス、東京都)

②高橋文雄、横山亜紀子、野崎久義 “三次共生型渦鞭毛藻 *Kryptoperidinium* の色素体についての考察” (2011年9月17日ー19日、日本植物学会第75回大会、東京大学駒場キャンパス、東京都)

③野崎久義、丸山真一朗、楊億、洲崎敏伸 “多遺伝子系統解析結果におけるハプト藻の系統的位置のゆらぎ” (2011年3月27日ー28日、日本藻類学会第35回大会、富山大学、富山市)

④楊億、丸山真一郎、関本弘之、坂山英俊、野崎久義 “広範囲な分子系統解析は緑色系二次共生藻の光合成 *PRK* 遺伝子が緑色ではない藻類からの起源を示す” (2011年3月27日ー28日、日本藻類学会第35回大会、富山大学、富山市)

⑤ Nozaki, H. “Genome information renewing the concept of Plantae” (Minisymposium “Comparative evolutionary genomics”), Ninth International Phycological Congress (National Olympic Memorial Youth Center, Japan, 2-8 August 2009)［招待講演］

⑥野崎久義、丸山真一朗、松崎素道、仲田崇志、加藤将、三澤計治 “緑色植物の姉妹群

とハプト植物の系統的位置”、 日本植物学会第73回大会（2009年9月18日ー20日、山形大学小白川キャンパス、山形市）

〔その他〕
ホームページ等
東京大学理学系研究科 プレスリリース「むかしむかし、ミドリムシは紅かった？」：
http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2011/08.html

新聞掲載：4月21日付の朝日小学生新聞第1面「ミドリムシは昔、赤かった？遺伝子を発見」

６．研究組織
(1)研究代表者
野崎　久義（NOZAKI HISAYOSHI）
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号：40250104

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし